

D 48469

Zárójelentés az „SHP1 szerepe a Fas-receptoron keresztül kiváltott jelátviteli útvonalak szabályozásában” című posztdoktori kutatómunkáról

Az egyik legjobban ismert sejthalált kiváltó jelátviteli útvonal a Fas (CD95/APO-1) receptoron keresztül kiváltott apoptotikus szignál. A Fas-L által történő oligomerizációt követően a FADD, kaszpáz 8 proenzim asszociációja, majd ezt követően a kaszpáz kaszkád beindításán keresztül kiváltott apoptotikus folyamatok jól ismertek. Egyre több adat utal azonban arra, hogy a Fas közvetített folyamatok nem jellemezhetőek ezen lineáris kaszkád eseményeivel.

A jelen pályázat célja volt B-sejteken Fas közvetített FADD független jelátviteli útvonalak szerepét tisztázni molekuláris szinten. Meg kívántuk vizsgálni vajon B-sejteken a Fas-receptor képes-e gátlószignálok közvetítésére az ITIM motívumhoz kapcsolódó foszfatázokon keresztül.

Előzetes eredményeink egy új eddig nem közölt Fas-közvetített jelátviteli útvonal kezdeti lépéseit írták le. Többek közt A20 egér B-sejt vonalat az SHP1 tirozin-foszfatáz mRNS-nek komplementer szakaszát termelő pSuper vektorral transzfektálva létrehoztunk SHP1-et csak csekély mértékben expresszáló klónokat. Az SHP1 negatív klónok esetében a Fas-receptoron keresztül kiváltott sejthalál mértéke jóval meghaladta a kontrol sejteken mért értéket. Valamint azonosítottuk a Vav adaptor fehérjét, mint az SHP1 szubsztrátját mivel a Fas receptor stimulációt követően a Vav defoszforilációját figyeltük meg. Ez a defoszforiláció azonban nem következett be az SHP1 hiányos sejtvonalakon.

Fontosabb új eredmények I:

- Vav siRNAi segítségével sikeresen csökkentettük A20 sejtvonalunkon a Vav fehérje mennyiségét. Az így kapott sejtvonalakon kimutattuk, hogy a Vav hiánya megnöveli a Fas receptoron keresztül kiváltott apoptózis mértékét. (40-ről 70%-ra)
- Kimutattuk, hogy a Vav mennyiségének csökkenése csak SHP1 jelenlétében növeli a Fas-indukált apoptózist. SHP1-negatív sejtvonalainkon ugyanis a Vav hiánya már nem volt képes tovább fokozni a megnövekedett sejthalál mértékét. Így feltételezzük, hogy a két molekula egy jelpályán helyezkedik el, valamint hogy az SHP1 által defoszforilált Vav negatív szabályozója a Fas-közvetített apoptotikus útvonalaknak.

- A Vav jól ismert mint a Rho családba tartozó fehérjék cserefaktora. Vizsgálataink szerint míg a Rho A illetve a Rac1 mennyiségének csökkentése nem befolyásolta a Fas-közvetített sejthalált, a CDC42 hiánya jelentősen növelte az apoptózist. A CDC42 hiánya azonban nem fokozta tovább az SHP-1 illetve a Vav hiányában megnövekedett sejthalál mértékét. Eredményeink így egy SHP1-Vav-CDC42 jelpályát feltételeznek, amelynek kulcsszerepe lehet a Fas-közvetített sejthalál szabályozásában.
- Kimutattuk továbbá az SHP1 asszociációját a Fas receptorhoz. Ez az asszociáció már nem aktivált sejteken is megfigyelhető volt, azonban FasL-dal történő aktiválást követően csökkent. Egyidejűleg a Fadd kaszpáz-8 Fas-hoz kötődésével. Valószínűsítjük, hogy az SHP1 konstitutívan gátolja a Fas receptor aktivációját.,
- Tanulmányoztuk, hogy vajon az SHP-1 hiánya hatással van-e a klasszikus kaszpáz kaszkád működésére vagy attól függetlenül szabályozza a Fas-indukált sejthalált. Kimutattuk, hogy SHP1 hiányban jelentősen megnő a Fadd, illetve a kaszpáz 8 kötődése a Fas receptorhoz, valamint felgyorsul a kaszpáz 8, kaszpáz 9, illetve a Parp hasítása, bizonyítva, hogy az SHP1 közvetített jelpálya közvetlenül szabályozza a klasszikus kaszpáz kaszkád kezdeti lépéseit.
- A fenti, sejtvonalon végzett kísérleteink megerősítésére megvizsgáltuk a Fas közvetített sejthalál mértékét Vav knockout egerek lépéből tisztított B-sejteken. A Vav csendesített sejtvonalakhoz hasonlóan a Vav hiányos lép B-limfociták esetén is megnövekedett a Fas indukált sejthalál mértéke a kontroll állatokhoz képest.
- Kimutattuk, hogy a Vav overexpressziója csökkenteni képes az SHP-1 hiányában megnövekedett fokozott sejthalált.

Eddigi eredményeink egy új jelátviteli útvonalat írnak le, mely útvonal szabályozni képes a Fas-közvetített sejthalált. Az SHP1-Vav irányított jelpálya működése eredeti célkitűzésünknek megfelelően FADD függetlennek bizonyult. Kimutattuk ugyanakkor, hogy az SHP1 jelenléte szabályozni képes a DISC (sejthalál indukáló komplex) kialakulását. Annak vizsgálatára, hogy az általunk leírt jelpálya milyen módon regulálja a Fas-indukált sejthalált illetve a DISC kialakulását, a Fas-citoszkeleton interakciót tanulmányoztuk.

Fontosabb új eredmények II:

- A Vav adaptor protein, illetve a CDC42 guanin-nukleozid cserefaktor egyaránt jól ismert, mint a citoszkeleton átrendeződés szabályozója. Megvizsgáltuk, hogy az SHP1-Vav-CDC42 útvonal befolyásolja-e a citoszkeleton átrendeződést a FasL indukciót követően. Eredményeink szerint a Fas internalizációja, mely szükséges a sejthalál indukciójához, jelentősen felgyorsult SHP1 hiányában.
- Ismert, hogy az aktin gátló LtnA hatására a Fas közvetített sejthalál mértéke csökken. SHP1 hiányában azonban csak az LtnA jóval nagyobb (-ötszörös) dózisa okozott hasonló mértékű gátlást, mint a kontrol sejteken, igazolva, hogy az SHP1 irányított útvonal a citoszkeleton átrendeződés szabályozásán keresztül hat a Fas közvetített jelátviteli útvonalakra.
- Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a Fas receptor- citoszkeleton kapcsolatot az ERM családba tartozó ezrin fehérje szabályozza. Ezrin hiányában a Fas-közvetített sejthalál nem figyelhető meg. Mivel eredményeink az SHP1 szerepét valószínűsítették a Fas indukált citoszkeleton átrendeződés szabályozásában, megvizsgáltuk van-e hatása az SHP1-nek az ezrin-Fas asszociációra. Kimutattuk, hogy SHP1 hiányában az ezrin intenzívebben és gyorsabban kötődik a Fashoz mint SHP1 jelenlétében.
- Mivel az SHP1 gátolta a Fas-ezrin kapcsolat kialakulását, feltételeztük, hogy szabályozni képes a Fas-aktin kapcsolatot is. Kimutattuk, hogy a feltételezésünknek megfelelően a Fas-aktin kapcsolódás intenzívebb SHP-1 hiányában.
- Az SHP1-ről eredményeink bizonyítják, hogy FasL stimulációt követően egyrészt defoszforilálja a Vav-ot, másrészt csökkent a Fas-citoszkeleton kapcsolat intenzitását, ezen hatásokon keresztül regulálva a DISC kialakulását, illetve a sejthalált. Hogy a két hatás független-e egymástól vagy ugyanazon útvonal szabályozásáról van-e szó, vizsgáltuk a Vav-aktin interakciót. Eredményeink bizonyítják, hogy az SHP1 által defoszforilált Vav képes kötődni az aktinhoz, megakadályozva az ezrin-aktin kapcsolat létrejöttét.
- Bizonyítottuk, hogy ezrin overexpresszió esetén a Vav-aktin kapcsolódás csökken, azaz az ezrin és a Vav valóban kompetálhat az aktin kötődésért.
- A fenti eredmények alapján feltételeztük, hogy az erősebb Fas-ezrin kapcsolat az SHP1 hiányához hasonlóan növeli a Fas közvetített apoptózis mértékét. Az ezrin

overexpressziója valóban fokozta a sejthalált (leszorítva a Vav-ot), azonban ezt SHP1 (defoszforilált Vav) hiányában már nem volt képes tovább fokozni.

Összességében kimutattuk, hogy az SHP1-Vav útvonal a Fas-citoszkeleton kapcsolat módosításán keresztül képes szabályozni a Fas-közvetített sejthalál folyamatait.

A pályázat első két, két és fél éves munkájában és az SHP-1, Vav szerepét vizsgáltuk a Fas-indukált sejthalál folyamataira. A nemzetközi irodalomban e két molekula és Fas receptor interakciója egyáltalán nem, (Vav) vagy alig (SHP-1) tanulmányozott. Így eredményeink egy jól ismert, intenzíven kutatott receptor esetben jelentenek újdonságot. (1. közlemény)

Fontosabb új eredmények III:

A Fas-Fadd-kaspáz 8 útvonal által szabályozott apoptotikus útvonalak jól ismertek, egyre több adat áll azonban rendelkezésre arról, hogy a Fas receptoron keresztüli aktiváció nem-apoptotikus útvonalakat is aktivál. A pályázat során vizsgálni kívántuk a Fas-indukált proliferatív szignálokat B sejteken.

- Kimutattuk, hogy szuboptimális dózisu FasL stimuláció nem sejthalált, hanem proliferációt indukál emberi mandulából, illetve egér lépből szeparált B-sejteken.
- Bizonyítottuk, hogy a Fas proliferatív hatása fokozta az a-IgM kiváltott proliferációt. Adataink bizonyítják, hogy amennyiben az antigént nagy affinitással felismerő B-sejtek a sejtfelszíni immunglobulinon keresztül érkező aktiváló szignáloknak köszönhetően megmenekülnek a Fas közvetített apoptózistól, a Fas jeletviteli kapacitása képes proliferációt indukálni.
- Vizsgáltuk a citoszkeleton átrendeződés hatását vizsgálva a Fas-közvetített jelátvitelre. Eredményeink szerint a citoszkeleton átrendeződés gátlása, megakadályozza a Fas indukált sejthalált, ugyanakkor részleges gátlás esetén fokozza, elősegíti a Fas-indukált proliferációt.
- Mivel az általunk vizsgált SHP1-Vav jelpálya a Fas-citoszkeleton kapcsolat szabályozója, feltételezzük, hogy a citoszkeleton átrendeződés módosításán keresztül a Fas-indukált proliferációt is befolyásolja. Előzetes eredményeink szerint az SHP1 hiánya csökkentette a Fas-közvetített proliferációt. (míg fokozta a Fas-indukált sejthalált.)
- A Fas-receptor szerepe a B-sejt szabályozásban főként a germinális centrumokban képződött, szomatikus mutáción átesett új B-sejt klónok szelekciójában van. A

germinális centrumban zajló reakciók során a megnövekedett Fas-expressziójú B-sejtek többféle stimulust kapnak egyidejűleg. A Fas illetve a BCR-en keresztül érkező jeleket, így interleukinok, komplement vagy Fc-receptorok egyaránt módosíthatják. Vizsgáltuk, hogy a BAFF (B-cell activating factor of the tumornecrosis factor family) képes-e befolyásolni a Fas jelátvitelét, szabályozza-e a BCR-Fas együttműködést. Kimutattuk, hogy a BAFF receptor aktivációja csökkenti a Fas-indukált sejthalált, valamint, hogy a BAFF stimulált túlélő szignálok nem additívak a BCR aktivációja által közvetített túlélő jelekkel.

A Fas-indukált proliferációt bemutató eredményeinket hazai kongresszusokon mutattuk be, míg a Fas-BCR, Fas-BAFF együttműködés leírását tartalmazza a 2. közlemény.

A kutatás összességében a pályázatban leírt téma vizsgálatával foglalkozott. A tervezett, 1. és 3. pontban leírt kísérletek nagyrészt megvalósultak, (a keresztezési kísérletek elkezdődtek) kiegészültek, eredményeinket publikáltuk. A pályázat 2. pontjának vizsgálata jelenleg is zajlik, kezdeti eredményeinket publikáltuk, a munka részletes folytatását a továbbiakban tervezzük.

A pályázat 4. pontjában leírt kísérletek nem valósultak meg, mivel (i) kimutattuk, hogy az általunk használt A20 sejtvonalon a Fas receptor stimulus nélkül is 90%-ban raft asszociált, a raft lokalizáció további fokozása FasL használatával sem érhető el. Így a tervezett kísérletek A20 sejtvonalon nem végezhetőek el, a többi eredménnyel összefüggően nem vizsgálhatóak. (ii) A kutatás hangsúlya a Fas-citoszkeleton kapcsolatra helyeződött, így a raft asszociáció vizsgálata háttérbe szorult.

A Fas receptor expressziója, funkciója B-sejtek esetén a germinális centrumokban aktiválódott B-sejteken bizonyított. Így eredményeink főként a germinális centrum reakciók pontosabb megértését segítik elő.

Az autoellenanyag termelő B-sejtek nagy része átesett szomatikus mutáción, mely a germinális centrumban történő B-sejt szelekció, ezen belül a Fas-közvetített sejthalál fontosságát bizonyítja. A Fas közvetített jelátvitel vizsgálata a germinális centrum reakciók során tehát közelebb vezethet bennünket a B-sejtes autoimmunitás megértéséhez.

További a germinális centrumhoz köthető B-sejtes diszfunkció a B-sejtes tumorok keletkezése. A B-sejtes limfómák 10-20-szor gyakoribbak, mint a T-sejtes limfómák, aminek egyik oka lehet a szomatikus mutáció elmaradása T-sejteken. Lpr^{cg} és gld állatokon, ahol a Fas szignalizációja hibásan működik, a B-sejtes limfómák kialakulási valószínűsége megnő.

Bár a Fas alapvetően, mint tumor szupresszor molekula működhet, az általa közvetített nem-apoptotikus szignálok tumorgenezist is indukálhatnak. Ismert például, hogy a Fas-indukált apoptózissal szemben rezisztens tumor sejteken a Fas aktivációja növelte a tumorok metasztatizáló és inváziós képességét.

Eredményeink a munka további folytatásával kiegészülve, tehát mind a B-sejtes autoimmunitás, mind a B-sejtes tumorok szabályozásának megértésében, ezek lehetséges terápiájában fontosak.

Budapest, 2008 február 25.

Koncz Gábor